

شدت آسیب اسید گالیک بر سلول های سرطانی پروستات به روش الکتروفورز قلیایی

جواد صفاری چالشتري^۱، مصطفی غلامی^۲، مهناز کلوشادی^۳، احسان حیدری^۴، اسفندیار حیدریان^{۵*}

^۱مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ ^۲مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ ^۳مرکز تحقیقات سلولی-مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ ^۴باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۳/۸/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۰/۳۰

چکیده:

زمینه و هدف: سرطان پروستات شایع ترین سرطان در جامعه مردان است. عوامل بسیار زیادی منجر به بروز این بیماری می شود. در عین حال فاکتورهای متعددی به منظور پیشگیری و یا درمان این بیماری شناسایی شده اند. آنتی اکسیدان ها و مخصوصاً ترکیبات پلی فنلی مانند اسید گالیک دارای ظرفیت بالقوه ای از این ویژگی هستند. در این مطالعه با استفاده از تکنیک الکتروفورز قلیایی، اثر اسید گالیک را بر لاین سلول های سرطانی Du145 پروستات مورد مطالعه قرار دادیم.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی، میزان زیست پذیری سلول های Du145 در مجاورت غلظت های مختلف گالیک اسید، به کمک روش رنگ سنجی تترازولیوم (MTT) اندازه گیری و غلظت مهارکنندگی ۵۰ درصد رشد سلول ها (IC₅₀) محاسبه شد. سه غلظت نزدیک به IC₅₀ از داروی اسید گالیک برای ۴۸ ساعت بر سلول های مذکور تیمار شد. پس از انجام الکتروفورز قلیایی تصاویر کامت های ایجاد شده با استفاده از نرم افزار CASP آنالیز شدند.

یافته ها: با استفاده از آزمون MTT و بر اساس مدل پرویت میزان IC₅₀ اسید گالیک برای سلول های Du145 برابر ۳۵ میکرومولار بدست آمد. در آزمون الکتروفورز قلیایی، برای سه غلظت ۲۵، ۳۰ و ۳۵ میکرومولار اسید گالیک، نسبت طول کامت به قطر سلول به ترتیب برابر ۶/۷±۱/۳، ۱۳/۸±۲/۶ و ۶۹/۴±۱/۲ بود.

نتیجه گیری: گالیک اسید به عنوان یک آنتی اکسیدان قدرتمند در غلظت های نزدیک به IC₅₀ اثر مهاری شدیدی بر رشد سلول های سرطان پروستات (لاین Du145) داشته و با اثر تخریبی بر ژنوم این سلول ها می تواند آپوپتوز را در آنان القاء کند.

واژه های کلیدی: سرطان پروستات، لاین سلولی Du145، گالیک اسید، الکتروفورز قلیایی.

مقدمه:

سرطان پروستات به عنوان یکی از شایعترین انواع سرطان در بین مردان است (۱). به طوری که در آمریکا به عنوان دومین سرطان شایع مردان شناخته شده است (۲). این سرطان در دو دهه اخیر در جوامع آسیایی نیز رو به گسترش بوده به طوری که در سال ۲۰۰۹ در تایوان از هر صد هزار نفر هشت نفر به این سرطان مبتلا بوده اند (۳). عوامل محیطی و عوامل ژنتیکی بسیار متنوعی در بروز انواع مختلف سرطان ها دخیل اند (۴). مطالعات بسیار گسترده ای نیز در خصوص شناسایی مکانیسم و نحوه بروز این بیماری صورت گرفته است. مطالعاتی که فرایندهایی از قبیل آنژیوژنز، مسیرهای انتقال پیام، مهاجرت های سلولی و آپوپتوز و همین طور بسیاری از انواع مکانیسم هایی که ارتباط آن ها با انواع سرطان ها را به خوبی مشخص می کند (۵). بسیاری از

سرطان پروستات به عنوان یکی از شایعترین انواع سرطان در بین مردان است (۱). به طوری که در آمریکا به عنوان دومین سرطان شایع مردان شناخته شده است (۲). این سرطان در دو دهه اخیر در جوامع آسیایی نیز رو به گسترش بوده به طوری که در سال ۲۰۰۹ در تایوان از هر صد هزار نفر هشت نفر به این سرطان مبتلا بوده اند (۳). عوامل محیطی و عوامل ژنتیکی بسیار

*نویسنده مسئول: شهرکرد- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد- مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی- تلفن: ۰۹۱۳۳۸۲۱۴۴۹، E-mail: j_safari@yahoo.com

ترکیباتی که قادر به مهار و یا القاء چنین فرایندهایی باشند به شدت مورد علاقه محققان قرار گرفته اند تا راهکارهایی مناسب را برای تولید داروهایی به منظور درمان و یا پیشگیری انواع سرطان ها ارائه دهند.

مطالعات نشان داده است که ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در بسیاری از گیاهان اثر مهارکنندگی بر رشد سلول های سرطانی دارد (۶). مطالعات اپیدمیولوژیک گسترده ای که بر روی ارتباط بین مصرف سبزیجات و میوه های غنی از ترکیبات آنتی اکسیدان با میزان شیوع سرطان انجام شده است نشان دهنده اهمیت جایگاه این ترکیبات در رژیم غذایی و مهار گسترش سرطان است (۷). ترکیبات پلی فنلی و آنتی اکسیدان های موجود در عصاره های گیاهان و همینطور ترکیباتی مانند ترپن ها، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها و بسیاری از مواد موثره دیگر از جمله ترکیباتی هستند که می توانند اثرات ضد سرطانی را در سلول القاء کنند (۸، ۹).

هسته دانه انگور (Grape Seed) سرشار از چندین ماده موثره و ترکیبات پلی فنلی فراوان و مخصوصاً گالیک اسید می باشد که منجر به مهار رشد سلول های MCF-7 در سرطان سینه، مهار رشد سلول های A-427 در سرطان ریه و همینطور موجب مهار رشد سلول های CRL-1739 در سرطان معده انسان می شود (۱۰). اسید گالیک موجود در هسته دانه انگور به خاطر فعالیت قوی آپوپتوزی خود منجر به مهار چرخه سلولی و تحریک آپوپتوز در سلول های سرطانی MB-MDA468 و سلول های DU145 در سرطان پروستات می شود و به دنبال آن مهار رشد و مرگ سلولی را موجب می شود (۱۰). علاوه بر دانه انگور در انواع بسیار زیادی از گیاهان، سبزیجات و میوه ها نیز می توان اسید گالیک را یافت که بطور بالقوه ای خاصیت ضد سرطان، ضد باکتریایی، ضد ویروسی و ضد التهاب داشته و همینطور یک خاصیت آنتی اکسیدان قدرتمند دارد (۱۱). با توجه به مطالعات وسیعی که بر روی اسید گالیک صورت گرفته است این نکته به خوبی استنتاج می شود که این ماده

آنتی اکسیدان به صورت هدفمند بر سلول های سرطان پروستات اثر سمی داشته و رشد آن ها را مهار می کند (۱۱). سبزیجات و میوه های تازه حاوی مقادیر متناسبی از انواع آنتی اکسیدان ها هستند و در بیشتر موارد نقش محافظتی ایفا می کنند؛ اما همواره مصرف بیش از حد ترکیبات آنتی اکسیدان می تواند اثرات سمی را بر سلول ها القاء کند (۱۲، ۱۳). بر این اساس، هدف از این مطالعه، بررسی اثر اسید گالیک به عنوان یک ماده آنتی اکسیدان قدرتمند در مهار رشد سلول های سرطانی از طریق تخریب ژنوم و القاء آپوپتوز بر روی سلول های لاین سرطانی Du145 پروستات با استفاده از تکنیک کامت (الکتروفورز قلیایی) بود.

روش بررسی:

در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی، لاین سلول های سرطان پروستات انسانی (Du145) از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. سلول ها را در محیط کشت RPMI-1640 (Gibco, Canada) غنی شده با ۱۰٪ سرم (FBS=Fetal bovine serum, Gibco, Canada) و L-glutamine (Gibco, Canada) و penicillin ۱۰^۶u/ml (Gibco, Canada) و Streptomycin ۱/۰mg/ml (Gibco, Canada) تحت شرایط کشت استاندارد (۳۷ درجه سانتی گراد، رطوبت ۹۵٪ و CO₂ ۵٪) کشت داده شدند (۱۲). به منظور به دست آوردن میزان زیست پذیری سلول ها در برابر اثرات سمی گالیک اسید از آزمون استاندارد MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-(BIO-IDEA)diphenyl-terazolium bromide] استفاده شد. به این ترتیب که در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه ای، تعداد تقریباً ۵×۱۰^۳ سلول سرطانی Du145 را در محیط کشت RPMI حاوی ده درصد FBS منتقل کرده و پس از آن به مدت یک شب در انکوباتور قرار گرفتند. بعد از آن محیط کشت سلول ها را با محیط کشت حاوی غلظت های مختلف گالیک اسید (سیگما، آمریکا) تعویض کرده و به مدت ۴۸ ساعت در

انکوباتور قرار گرفتند. سپس محیط کشت حاوی گالیک اسید را از هر خانه از پلیت حذف کرده و سلول های هر خانه با PBS شستشو شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر RPMI و ۱۰۰µL از محلول MTT با غلظت ۱۲mM به هر خانه از پلیت اضافه گردید و پلیت به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. سپس جذب نوری آن با استفاده از دستگاه الیزا (stat Fax-2100, Spain) با طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه گیری شد. این آزمون برای غلظت های مختلف گالیک اسید ۳ بار به صورت سه تایی انجام شد. درصد زیست پذیری سلول های تحت درمان در مقایسه با سلول های درمان نشده طبق فرمول زیر محاسبه و غلظت مهارکنندگی ۵۰ درصد رشد سلول ها (IC_{50}) محاسبه شد (۱۴، ۱۵).

"۱۰۰× جذب نوری گروه کنترل/جذب نوری گروه درمان شده"

پس از آنکه میزان زیست پذیری سلول های Du145 در برابر اثرات سمی گالیک اسید مشخص شد و مقدار IC_{50} آن بدست آمد، سلول ها برای مراحل بعدی و انجام آزمون الکتروفورز قلیایی یا کامت اسی (comet assay) مورد استفاده قرار گرفت. در این آزمایش از دو غلظت پایین تر از IC_{50} نیز استفاده شد. سلول های Du145 تیمار نشده به عنوان نمونه های کنترل منفی و سلول های Du145 تیمار شده با غلظت ۵۰µM از H_2O_2 به عنوان نمونه های کنترل مثبت در نظر گرفته شد (۱۶).

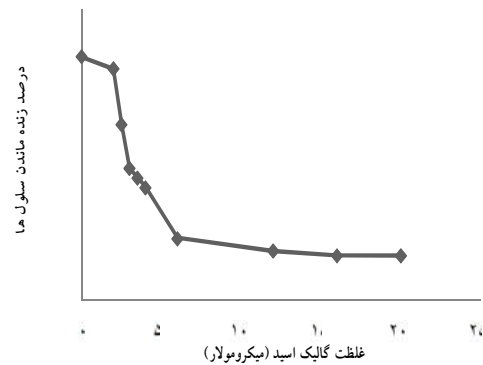
به منظور انجام آزمون کامت اسی ابتدا لام ها به خوبی با متانول شسته و سپس به آرامی حرارت داده شدند. ۳۰۰ میکرولیتر از آگاروز ۱٪ با نقطه ذوب معمولی (ژن فناوری، ایران) را در بافر PBS حل کرده، بر روی لام ریخته و پس از لامل گذاری سریعاً بر روی یخ قرار گرفت تا سفت شود. پس از جدا کردن لامل، برای ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد تا کاملاً خشک شود. سپس ۱۰ میکرولیتر حاوی حدود ۱۰۰ هزار سلول را در ۸۰ میکرولیتر آگاروز ۱٪ با نقطه

ذوب پایین (ژن فناوری، ایران) در فسفات بافر سالین (PBS) به خوبی مخلوط کرده و ۱۰ میکرولیتر آنرا بر روی لایه اول لام ریخته و سریعاً لامل گذاری شد تا لایه دوم شکل بگیرد. پس از سرد شدن، لامل را به آرامی برداشته و لایه سوم را که حاوی آگاروز ۱٪ نقطه ذوب معمولی (ژن فناوری، ایران) در بافر PBS است بر روی لام قرار دادیم. سپس لام ها را برای مدت ۲۴ ساعت در ۱۰۰ میلی لیتر محلول بافر لیز کننده حاوی ۰/۰۱M Na_2EDTA (مرک آلمان) و ۰/۰۱M Trizma base (مرک آلمان) و ۲/۵M $NaCl$ (مرک آلمان) به همراه یک میلی لیتر تریتون ۱۰۰ X1 (مرک آلمان) و محلول تازه ۱۰٪ دی متیل سولفات (DMSO، مرک آلمان) در جای تاریک و سرد قرار گرفت. پس از آن لام ها به آرامی به محلول بافر قلیایی شامل Na_2EDTA و $NaCl$ با pH برابر ۱۳ برای ۳۰ دقیقه منتقل شدند و جریان برق با ۲۵V و ۳۰۰mA برای ۴۰ دقیقه در تانک الکتروفورز افقی (ATTO ژاپن) برقرار شد. پس از آن لام ها توسط محلول خنثی کننده حاوی محلول ۰/۴M $Tris-HCl$ (مرک آلمان) با pH برابر ۷/۵ برای سه مرتبه شسته شدند. پس از آن لام ها برای سه مرتبه با اتانول ۹۵ درجه شسته شده و در نهایت در محلول اتیدیوم بروماید با غلظت ۲۰µg/ml رنگ آمیزی و با استفاده از میکروسکوپ فلورسانت و عدسی شیئی ۴۰X مشاهده شدند. نسبت طول دنباله کامت به قطر سلول جهت تعیین میزان شکست مورد استفاده قرار گرفت. برای هر غلظت ۱۰۰ تصویر سلولی توسط نرم افزار CASP version 1.2.2 آنالیز شده و پس از آن نتایج حاصل را با استفاده از نرم افزار آماری SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (۱۷).

یافته ها:

در غلظت ۳۵µM گالیک اسید نیمی از سلول های Du145 زنده ماندند. با افزایش غلظت گالیک اسید میزان زیست پذیری و بقاء سلول های

Du145 کاهش یافت. IC_{50} ، گالیک اسید برای سلول های Du145 ۳۵ میکرومولار به دست آمد، این در حالی است که در غلظت های ۲۵ و ۳۰ میکرومولار گالیک اسید میزان بقاء سلول ها بیش از ۶۰ درصد بود (نمودار شماره ۱).



نمودار شماره ۱: بررسی میزان زیست پذیری سلول های

Du145 در برابر غلظت های مختلف گالیک اسید.

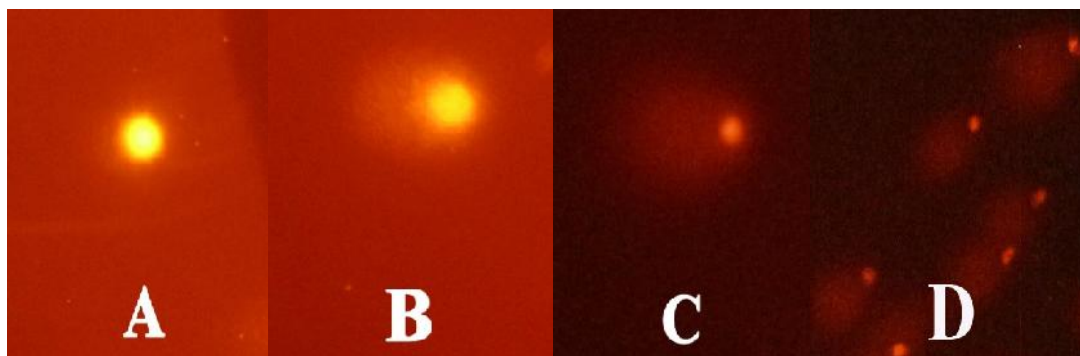
در غلظت ۳۵ میکرومولار گالیک اسید ۵۰ درصد از سلول زنده مانده اند.

در آزمون کامت اسی و الکتروفورز قلیایی برای سلول های Du145 تیمار نشده با داروی گالیک اسید هیچ گونه کامتی مشاهده نشد و نسبت طول کامت به قطر سلول در این حالت برابر $1/3 \pm 0/2$ درصد بود. این در حالی است که سلول های Du145 تیمار شده با محلول $50 \mu M$ H_2O_2 دارای طول کامت بسیار گسترده و نسبت طول کامت به قطر سلول برابر $72/1 \pm 4/1$ درصد بودند. این نتایج در خصوص سلول های Du145 تیمار شده با غلظت های مورد مطالعه یعنی در غلظت $25 \mu M$ گالیک اسید نسبت طول کامت به قطر سلول برابر $6/7 \pm 1/3$ درصد و در غلظت $30 \mu M$ گالیک اسید نسبت طول کامت به قطر سلول برابر $13/8 \pm 2/6$ درصد و در غلظت $35 \mu M$ گالیک اسید یعنی در غلظت IC_{50} نسبت طول کامت به قطر سلول برابر $69/4 \pm 1/2$ مشاهده شد. (جدول و تصویر شماره ۱)

جدول شماره ۱: نتایج آزمون کامت (comet assay) سلول های Du145 در گروه های مختلف

| پارامترها | گروه ها | بدون تیمار (کنترل منفی) | تیمار شده با $50 \mu M$ H_2O_2 (کنترل مثبت) | تیمار شده با $25 \mu M$ گالیک اسید | تیمار شده با $30 \mu M$ گالیک اسید | تیمار شده با $35 \mu M$ گالیک اسید |
|--------------------------------------|---------|-------------------------|---|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| ناحیه ی سر کامت | | $534/3 \pm 100/9$ | $170/5 \pm 87/3$ | $517/3 \pm 39/8$ | $526/1 \pm 80/2$ | $408/5 \pm 36/1$ |
| محدوده ی دنباله ی کامت | | $7/3 \pm 3/5$ | $1193/9 \pm 377/4$ | $133/1 \pm 27/6$ | $247/1 \pm 43/3$ | $1394/4 \pm 9/8$ |
| مقدار DNA در سر کامت | | $26/8 \pm 2/6$ | $9/6 \pm 4/3$ | $48/1 \pm 1/8$ | $47/0 \pm 7/8$ | $19/4 \pm 1/5$ |
| مقدار DNA در دنباله کامت | | $0/9 \pm 0/1$ | $25/8 \pm 12/8$ | $3/4 \pm 0/7$ | $7/3 \pm 0/1$ | $43/9 \pm 0/1$ |
| درصد طول سر کامت به دنباله کامت | | $98/7 \pm 0/2$ | $27/9 \pm 4/1$ | $93/3 \pm 1/3$ | $86/2 \pm 2/6$ | $30/6 \pm 1/2$ |
| *درصد طول دنباله کامت به سر کامت | | $1/3 \pm 0/2$ | $72/1 \pm 4/1$ | $6/7 \pm 1/3$ | $13/8 \pm 2/6$ | $69/4 \pm 1/2$ |
| شعاع سر کامت برحسب تعداد پیکسل | | $3/3 \pm 0/5$ | $39/8 \pm 2/3$ | $4/9 \pm 1/5$ | $8/9 \pm 2/1$ | $30/1 \pm 0/8$ |
| طول دنباله کامت از حاشیه ی سمت راست | | $29/8 \pm 2/8$ | $4/6 \pm 54/8$ | $30/8 \pm 1/2$ | $36/1 \pm 2/2$ | $53/4 \pm 1/3$ |
| طول کل کامت از حاشیه ی سمت چپ | | $0/1 \pm 0/0$ | $28/7 \pm 3/1$ | $0/4 \pm 0/14$ | $1/3 \pm 0/0$ | $20/9 \pm 0/7$ |
| درصد DNA در دم کامت ضریب طول دم کامت | | $534/3 \pm 100/9$ | $170/5 \pm 87/3$ | $517/3 \pm 39/8$ | $526/1 \pm 80/2$ | $408/5 \pm 36/1$ |

*نسبت طول دنباله کامت به قطر سلول با افزایش غلظت گالیک اسید افزایش می یابد؛ داده ها به صورت میانگین \pm انحراف می باشد.



تصویر شماره ۱: اندازه طول دنبالچه کامت در نمونه های مورد مطالعه

A: نمونه سلول های *Du145* تیمار شده با ۲۵ میکروگرایک اسید؛ B: نمونه سلول های *Du145* تیمار شده با ۳۰ میکروگرایک اسید؛ C: نمونه سلول های *Du145* تیمار شده با ۳۵ میکروگرایک اسید، با افزایش غلظت گالیک اسید طول دنبالچه کامت افزایش می یابد؛ D: نمونه سلول های *Du145* تیمار شده با $50H_2O_2$ میکرومولار.

بحث:

پیشگیری و درمان سرطان ها و مخصوصاً سرطان پروستات داشته باشد (۲۱). مواد موثره موجود در عصاره دانه انگور یک مهارکننده قدرتمند در مهار انواع بسیار زیادی از سلول های سرطانی است (۲۲). Durak و همکارانش نیز نشان دادند که رشد سلول های *Du145* در حضور عصاره استخراج شده از دانه انگور به طور قابل توجهی مهار می شود (۲۳) که با نتایج بدست آمده در این تحقیق همخوانی دارد. اسید گالیک از جمله ترکیبات پلی فنلی موجود در بسیاری از گیاهان مخصوصاً دانه انگور، برگ چای، توت فرنگی، سیب و بسیاری دیگر از میوه ها و سبزیجات است (۲۴، ۲۵). مطالعات بسیاری در ارتباط با خواص اسید گالیک و ویژگی های آنتی باکتریالی و ضد ویروسی، همچنین ارتباط آن با کاهش هیپرلیپیدمی و استرس اکسیداتیو انجام شده است (۲۸-۲۶). این ترکیب آنتی اکسیدانی قدرتمند با خواص ضد سرطانی توجه بسیاری از دانشمندان را به خود جلب کرده است (۲۹، ۳۰). مطالعات *invivo* و *invitro* صورت گرفته توسط محققان نیز بر خواص ضد سرطانی اسید گالیک تأکید می کنند (۳۱، ۳۲). Kaur و همکاران با مطالعه خود بر روی لاین های سرطانی سلول های *Du145* و *22Rv1* تأثیرات گالیک اسید را بر مهار رشد این سلول ها بررسی کردند.

محققان بر این اعتقادند که استفاده از مواد غذایی گیاهی، میوه و سبزیجات در رژیم غذایی می تواند به طور موثری از بروز بسیاری از بیماری ها مخصوصاً انواع سرطان ها جلوگیری کند. هر چند این دسته از مواد غذایی حاوی مقادیر بسیار اندکی انرژی برای مصرف روزانه هستند؛ اما سرشار از ترکیبات بسیار حیاتی از قبیل ویتامین ها، فلاونوئیدها، پلی فنل ها و انبوه دیگری از آنتی اکسیدان هایی هستند که برای پیشبرد فعالیت های آنزیمی واکنش های بیوشیمیایی ضروری اند (۱۸). سال هاست مطالعات گسترده ای که بر روی چنین ترکیباتی انجام شده است ارتباط متقابل مصرف چنین مواد غذایی را با جلوگیری از پیشرفت سرطان ها نشان داده است (۱۹). Jatoti و همکارانش در سال ۲۰۰۳ با مطالعه ای که بر روی بیماران مبتلا به سرطان پروستات داشتند مشاهده کردند که برگ های چای سبز در درمان این بیماران بسیار موثر است (۲۰). Khan و همکارانش در سال ۲۰۰۶ در یک مطالعه مروری بیان داشتند که (epigallocatechin-3-gallate= EGCG) به عنوان یکی از مهمترین ترکیبات موجود در چای سبز با تأثیر گذاشتن بر چرخه سلولی و مهار بسیاری از انکوژن ها و همینطور القاء فاکتورهای محافظتی سلول می تواند نقش موثری در

نتیجه گیری:

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ترکیب آنتی اکسیدانی گالیک اسید قادر است میزان شکست ژنوم را در سلول های DU145 افزایش دهد، به طوری که در غلظت IC_{50} این میزان شکست و تخریب ژنوم در بیشترین حالت ممکن بوده و توانسته بیشترین آسیب را بر سلول های سرطانی لاین DU145 وارد کند. این آسیب می تواند در اثر القاء آپوپتوز در سلول ها ایجاد شده باشد.

تشکر و قدردانی:

بر خود لازم می دانیم، از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد به خاطر حمایت های مالی برای انجام این مطالعه نهایت قدردانی به عمل آید. همینطور از کلیه پرسنل مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، سلولی-مولکولی و گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد به خاطر همکاری بی دریغ شان بی نهایت سپاسگذاریم.

در همین مطالعه آنان مشاهده کردند که این ترکیب پلی فنلی قادر است اندازه تومورهای گزنوگراف شده موش های آزمایشگاهی را به شدت کاهش دهد (۱۱)؛ اما اینکه چه غلظتی از این ماده موثره می تواند بر سلول های سرطانی سمیت القا کند و برای سایر سلول ها آسیب کمتری به همراه داشته باشد از اهمیت ویژه ای برخوردار است. برای رسیدن به این هدف، محققان روش های متنوعی را آزموده اند.

تکنیک کامت اسی یک تکنیک سریع، ارزان قیمت و بسیار دقیق می باشد و در آن شکست های تک رشته ای DNA براحتی قابل تشخیص است. مطالعات بسیار زیادی با استفاده از این روش برای بررسی میزان شکست های DNA و آسیب های ژنومی صورت گرفته است (۳۳). Collins و همکارانش نیز شکست های تک رشته ای را با استفاده از روش کامت اسی در سلول های لنفوسیت آسیب دیده بررسی کردند (۳۴).

منابع:

1. Kilickesmez O, Cimilli T, Inci E, Kayhan A, Bayramoglu S, Tasdelen N, et al. Diffusion-weighted MRI of urinary bladder and prostate cancers. *Diagn Interv Radiol*. 2009; 15(2): 104-10.
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2009; 59(4): 225-49.
3. Liu KC, Huang AC, Wu PP, Lin HY, Chueh FS, Yang JS, et al. Gallic acid suppresses the migration and invasion of PC-3 human prostate cancer cells via inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9 signaling pathways. *Oncol Rep*. 2011; 26(1): 177-84.
4. Cho YG, Kim CJ, Park CH, Yang YM, Kim SY, Nam SW, et al. Genetic alterations of the KLF6 gene in gastric cancer. *Oncogene*. 2005; 24(28): 4588-90.
5. Davies MA, Kim SJ, Parikh NU, Dong Z, Bucana CD, Gallick GE. Adenoviral-mediated expression of MMAC/PTEN inhibits proliferation and metastasis of human prostate cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2002; 8(6): 1904-14.
6. Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3(10): 768-80.
7. Weisburger JH. Nutritional approach to cancer prevention with emphasis on vitamins, antioxidants, and carotenoids. *Am J Clin Nutr*. 1991; 53(1 Suppl): 226S-37S.
8. Cragg GM, Newman DJ. Plants as a source of anti-cancer agents. *J Ethnopharmacol*. 2005; 100(1-2): 72-9.
9. Uruena C, Cifuentes C, Castaneda D, Arango A, Kaur P, Asea A, et al. Petiveria alliacea extracts uses multiple mechanisms to inhibit growth of human and mouse tumoral cells. *BMC Complement Altern Med*. 2008; 8: 60.

10. Veluri R, Singh RP, Liu Z, Thompson JA, Agarwal R, Agarwal C. Fractionation of grape seed extract and identification of gallic acid as one of the major active constituents causing growth inhibition and apoptotic death of DU145 human prostate carcinoma cells. *Carcinogenesis*. 2006; 27(7): 1445-53.
11. Kaur M, Velmurugan B, Rajamanickam S, Agarwal R, Agarwal C. Gallic acid, an active constituent of grape seed extract, exhibits anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-tumorigenic effects against prostate carcinoma xenograft growth in nude mice. *Pharm Res*. 2009; 26(9): 2133-40.
12. Greenwald P, Clifford CK, Milner JA. Diet and cancer prevention. *Eur J Cancer*. 2001; 37(8): 948-65.
13. Kaur C, Kapoor HC. Antioxidants in fruits and vegetables—the millennium's health. *International J Food Sci Tech*. 2001; 36(7): 703-25.
14. Kotake-Nara E, Kushihiro M, Zhang H, Sugawara T, Miyashita K, Nagao A. Carotenoids affect proliferation of human prostate cancer cells. *J Nutr*. 2001; 131(12): 3303-6.
15. Kumi-Diaka J, Sanderson NA, Hall A. The mediating role of caspase-3 protease in the intracellular mechanism of genistein-induced apoptosis in human prostatic carcinoma cell lines, DU145 and LNCaP. *Biol Cell*. 2000; 92(8-9): 595-604.
16. Benhusein GM, Mutch E, Aburawi S, Williams FM. Genotoxic effect induced by hydrogen peroxide in human hepatoma cells using comet assay. *Libyan J Med*. 2010; 5: 10.
17. Liao W, McNutt MA, Zhu WG. The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods*. 2009; 48(1): 46-53.
18. Le Marchand L. Cancer preventive effects of flavonoids--a review. *Biomed Pharmacother*. 2002; 56(6): 296-301.
19. Collins AR, Ma AG, Duthie SJ. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat Res*. 1995; 336(1): 69-77.
20. NJatoi A, Ellison N, Burch PA, Sloan JA, Dakhil SR, Novotny P, et al. A phase II trial of green tea in the treatment of patients with androgen independent metastatic prostate carcinoma. *Cancer*. 2003; 97(6): 1442-6.
21. Khan N, Afaq F, Saleem M, Ahmad N, Mukhtar H. Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Res*. 2006; 66(5): 2500-5.
22. Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, Das DK, Ray SD, Kuszynski CA, et al. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology*. 2000; 148(2-3): 187-97.
23. Durak I, Cetin R, Devrim E, Erguder IB. Effects of black grape extract on activities of DNA turn-over enzymes in cancerous and non-cancerous human colon tissues. *Life Sci*. 2005; 76(25): 2995-3000.
24. Chu YF, Sun J, Wu X, Liu RH. Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. *J Agric Food Chem*. 2002; 50(23): 6910-6.
25. Wolfe K, Wu X, Liu RH. Antioxidant activity of apple peels. *J Agric Food Chem*. 2003; 51(3): 609-14.
26. Kang MS, Oh JS, Kang IC, Hong SJ, Choi CH. Inhibitory effect of methyl gallate and gallic acid on oral bacteria. *J Microbiol*. 2008; 46(6): 744-50.
27. Kratz JM, Andrighetti-Frohner CR, Leal PC, Nunes RJ, Yunes RA, Trybala E, et al. Evaluation of anti-HSV-2 activity of gallic acid and pentyl gallate. *Biol Pharm Bull*. 2008; 31(5): 903-7.
28. Hsu C-L, Yen G-C. Effect of gallic acid on high fat diet-induced dyslipidaemia, hepatosteatosis and oxidative stress in rats. *Br J Nutr*. 2007; 98(04): 727-35.

29. Inoue M, Sakaguchi N, Isuzugawa K, Tani H, Ogihara Y. Role of reactive oxygen species in gallic acid-induced apoptosis. *Br J Nutr.* 2000; 23(10): 1153-7.
30. Faried A, Kurnia D, Faried LS, Usman N, Miyazaki T, Kato H, et al. Anticancer effects of gallic acid isolated from Indonesian herbal medicine, *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl, on human cancer cell lines. *Int J Oncol.* 2007; 30(3): 605-13.
31. Galati G, O'Brien PJ. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic Biol Med.* 2004; 37(3): 287-303.
32. Gomes CA, da Cruz TG, Andrade JL, Milhazes N, Borges F, Marques MP. Anticancer activity of phenolic acids of natural or synthetic origin: a structure-activity study. *J Med Chem.* 2003; 46(25): 5395-401.
33. Frenzilli G, Nigro M, Lyons BP. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutat Res.* 2009; 681(1): 80-92.
34. Collins AR, Dusinska M, Horska A. Detection of alkylation damage in human lymphocyte DNA with the comet assay. *Acta Biochim Pol.* 2001; 48(3): 611-4.

Damage intensity of gallic acid on prostatic cancer cells line Du145 by alkaline electrophoresis

Safari-Chaleshtori J¹, Gholami M², Keloushadi M³, Heidari E⁴, Heidarian E^{1*}

¹Clinical Biochemistry Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran; ²Medical Plants Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran; ³Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran; ⁴Young Researchers and Elites Club, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, I.R. Iran.

Received: 16/Nov/2014 Accepted: 20/Jan/2015

Background and aims: Prostatic cancer is one of the most widespread cancers in men in all over the world. There are many reagents that cause to prostate cancer, but many factors recognized to prevent or treat this cancer. This capacity is in anti-oxidants and, especially in polyphenol compounds like Gallic acid. This study was aimed to investigate the effect of gallic acid on Du145 cells line in prostatic cancer by alkaline electrophoresis technique.

Methods: In this Laboratory experimental study, MTT assay was used to determine the viability of Du145 cells line in the adjacent of different concentrations of gallic acid and IC50. Three concentrations around the IC50 of Gallic acid were treated on cells for 48 hours. Comet pictures have been analyzed using CASP software after alkaline electrophoresis.

Results: 35 µM of Gallic acid for Du145 cells was determined based on probit model with IC50 with MTT test. Rate of tail to head in alkaline electrophoresis for three concentrations around the IC50 (25, 30 and 35) µM of Gallic acid was 6.7±1.3, 13.8±2.6 and 69.4±1.2 percent, respectively.

Conclusion: Gallic acid is one of the most powerful anti-oxidants that can reduce the growth of Du145 cells in prostatic cancer and inhibits the cell growth with destroy their genome and induce the apoptosis.

Key words: Prostatic cancer, Du145 cells line, Gallic acid, Comet assay.

Cite this article as: Safari-Chaleshtori J, Gholami M, Keloushadi M, Heidari E, Heidarian E. Damage intensity of gallic acid on prostatic cancer cells line Du145 by alkaline electrophoresis. J Shahrekord Univ Med Sci. 2015; 17(3): 48-56.

***Corresponding author:**

Clinical Biochemistry Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran, Tel: 00989133821449, E-mail: j_safari@yahoo.com